

Modelo experimental de tabagismo para indução de neoplasia da bexiga urinária

Tobacco experimental model to induce urinary bladder neoplasms

JOSÉ ALEXANDRE COLLI NETO¹; JOSÉ HÉLIO ZEN JÚNIOR¹; ANDRÉ DEL NEGRO, ACBC-SP²; NELSON ADAMI ANDREOLLO, TCBC-SP²; MARINA RACHEL ARAUJO³; ALFIO JOSÉ TINCANI²

R E S U M O

Objetivo: desenvolver modelo experimental de exposição aos produtos da queima do tabaco (cigarro) para avaliar os efeitos do seu uso crônico em relação às neoplasias de bexiga. **Métodos:** Os animais foram expostos cronicamente aos produtos da queima do tabaco em câmara semi-aberta para simular o tabagismo. Trinta ratos jovens da raça Wistar foram distribuídos em dois grupos: um com 20 animais simulando o tabagismo por período de seis meses, e um com dez animais controle sem exposição por igual período. Após exposição por inalação da fumaça do cigarro, os animais foram eutanasiados e submetidos a estudo histopatológico da parede da bexiga. **Resultados:** Não foi encontrada neoplasia e sim alterações leves e não significativas. Os estudos da hemo-oximetria (carboxiemoglobina e metemoglobina) e da concentração de dióxido de carbono (CO₂) confirmam que os animais foram expostos a altas concentrações da fumaça do tabaco e de seus derivados. **Conclusão:** No estudo anatomopatológico dos animais não foi encontrada neoplasia na mucosa da bexiga. Os modelos experimentais desenvolvidos foram altamente eficientes, práticos e fáceis de usar podendo ser empregados em outros estudos semelhantes para determinar os efeitos nocivos causados pelo tabagismo.

Descritores: Experimentação animal. Inalação. Tabagismo. Ratos. Neoplasias da bexiga urinária.

INTRODUÇÃO

O tabagismo está associado a várias doenças, sendo responsável por aproximadamente cinco milhões de mortes ao ano no mundo e cerca de 200.000 no Brasil¹. É considerado pela organização Mundial de Saúde (OMS) a maior causa de morte evitável². Muitas doenças são provocadas pelo hábito de fumar e isto ocorre porque as patologias relacionadas ao tabaco costumam apresentar certa latência para desenvolver sintomas, gerando certa negligência em relação aos seus riscos.

O câncer de bexiga é uma neoplasia que acomete, principalmente, homens brancos da sexta e sétima décadas de vida e pode se desenvolver a partir das células transitórias do urotélio. Metade dos casos diagnosticados apresenta como hábito o tabagismo e, além disso, a doença costuma ter relação com fatores ocupacionais, adoçantes e analgésicos. Dos casos diagnosticados, 90% são carcinomas urotelial de bexiga (nas três camadas externas do órgão) e, dentre eles, 75% são superficiais. Apenas 5% a 8% dos casos são do tipo carcinoma de células escamosas (espinocelular) que podem invadir camadas mais profundas e 2% são adenocarcinomas, que apresentam maior potencial de invasão local. É o segundo tipo mais comum de câncer na região genital. Em casos mais avançados podem invadir a parede externa da bexiga e atingir

outros órgãos. Como o epitélio que recobre a bexiga e parte da uretra é o mesmo, os tumores que se desenvolvem nessas estruturas têm características muito semelhantes³. Para reduzir o risco de morte pela doença, o diagnóstico precoce é muito importante⁴.

Sabe-se que o tabagismo é o maior fator de risco para o câncer de bexiga, com um risco duas a quatro vezes maior que os não-fumantes, embora só a metade destes pacientes seja fumante.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo experimental de exposição aos produtos da queima do tabaco (cigarro) para avaliar os efeitos do seu uso crônico em relação às neoplasias de bexiga.

MÉTODOS

Trinta ratos machos jovens da raça Wistar pesando entre 300 e 400g escolhidos aleatoriamente foram estudados. Os animais foram acondicionados em gaiolas comuns para a espécie, revestidas com maravalha e mantidos no Biotério no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental. A pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo 1441-1/2008).

Os cigarros foram empregados para estudar as possíveis alterações histológicas nos animais a partir da ex-

1. Faculdade de Medicina da UNICAMP; 2. Departamento de Cirurgia da UNICAMP; 3. Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP.

posição crônica e continham as seguintes especificações: Alcatrão 10mg/cigarro; Nicotina 0,8mg/cigarro; monóxido de carbono (CO) 10mg/cigarro. Para todos os animais foi oferecida água *ad libitum* e cada um recebeu uma numeração própria, marcada no pelo corpóreo. Os grupos de animais foram assim distribuídos: Grupo I – 20 animais submetidos diariamente à inalação da fumaça de cigarro em câmara de exposição. Os animais desse grupo foram submetidos à exposição de fumaça (8 cigarros por dia) pelo período de seis meses, período considerado suficiente para causar alterações na mucosa, pois, em média, um mês de vida do animal corresponde aproximadamente a cinco anos de vida do homem⁵. Na câmara de exposição também foi feita a contagem do número de partículas de CO; Grupo II – dez animais controle submetidos que receberam água e ração *Ad libitum*.

A exposição à fumaça foi realizada em câmara, como a descrita por Wright *et al.*⁶ e modificada por Biselli *et al.*⁷ (Figura 1) composta por recipiente hermético para acondicionar os animais, acoplado a um cilindro de ar comprimido, cujas partículas foram aceleradas num sistema de fluxo laminar com queda de pressão, dependente do fluxo e aceleração. Mediante redução do diâmetro transversal do tubo, utilizando-se uma pipeta interposta, o ar comprimido foi acelerado (de maneira constante, porém ao passar pela ponteira da pipeta adquirindo uma velocidade maior). Quando a pressão neste ponto sofria queda abaixo da pressão atmosférica produzia-se o efeito desejado: aspiração da fumaça do cigarro, na outra extremidade do sistema (efeito Venturi).

Um tanque de ar comprimido pressurizava a câmara por meio de um conduto de ar sendo acoplado ao

sistema acima descrito para obtenção de maior quantidade de fumaça produzida pela queima dos cigarros. Dentro da câmara foram colocados os cigarros já acesos com a extremidade do filtro conectada a outro conduto de ar o qual conduz a fumaça diretamente à câmara de exposição, obtendo-se assim um significativo aumento na quantidade de fumaça produzida e inalada pelos animais.

Durante o tempo de observação os animais receberam dieta com ração padrão e seus pesos foram monitorados mensalmente.

Em dois momentos do estudo foi realizada a hemo-oximetria dos animais para avaliar a eficácia da câmara de exposição.

A aferição foi realizada em dois animais expostos à fumaça e um animal controle, sendo que os expostos à fumaça foram avaliados em dois tempos: cinco minutos e dez minutos de exposição. Os itens analisados foram: hemoglobina (Hb), oxiemoglobina (HBO₂), carboxiemoglobina (HbCO), metaemoglobina (MetHb), oxigênio total (O₂ total), aos cinco minutos de exposição (5') e aos dez minutos de exposição (10').

A concentração de dióxido de carbono (CO₂) no interior da câmara de exposição, após a queima do terceiro cigarro, foi aferida diariamente por duas semanas.

Os ratos foram eutanasiados por prolongamento anestésico com tiopental endovenoso em dose letal de 2ml/kg/peso. O órgão para estudo histopatológico foi obtido a partir de dissecação da bexiga urinária, removendo-o totalmente. As peças foram fixadas em formalina por 24 horas e, em seguida, armazenadas em solução de álcool 70% e fixadas em blocos de parafina. Os cortes seriados foram preparados em lâminas e os fragmentos corados com

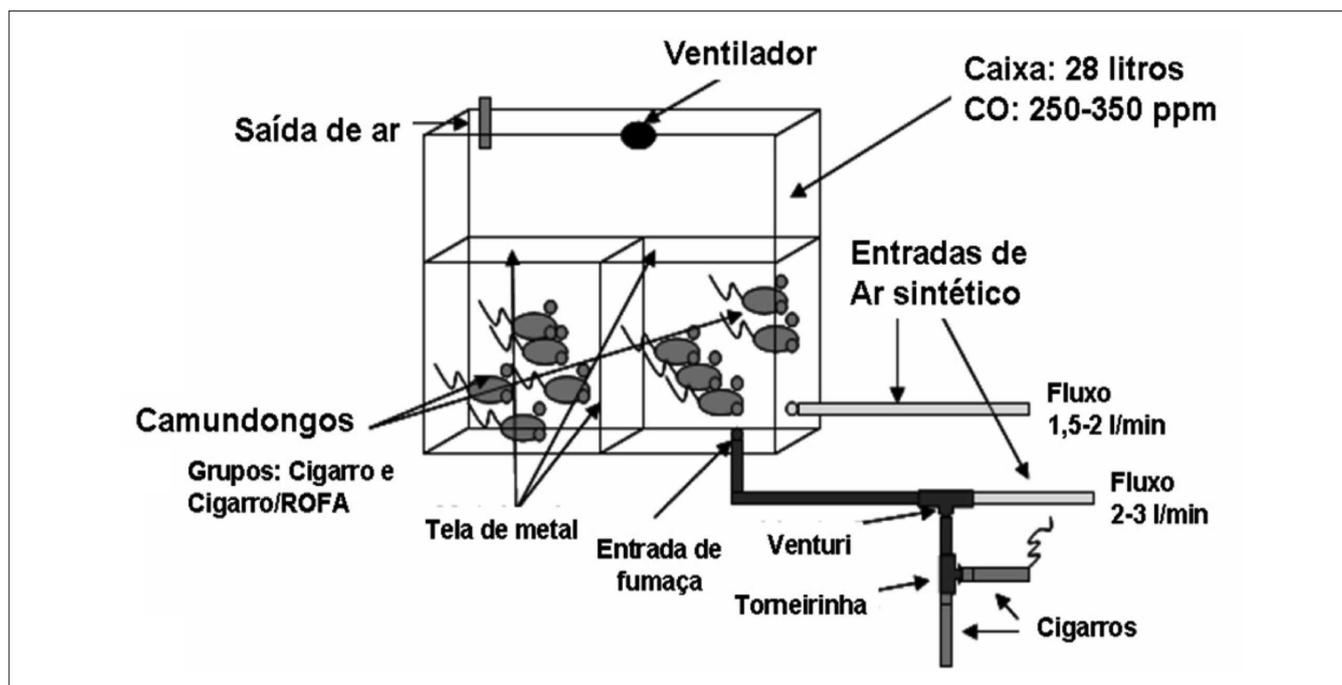


Figura 1 - Câmara de exposição à fumaça dos cigarros (cedida por Biselli *et al.*⁷).

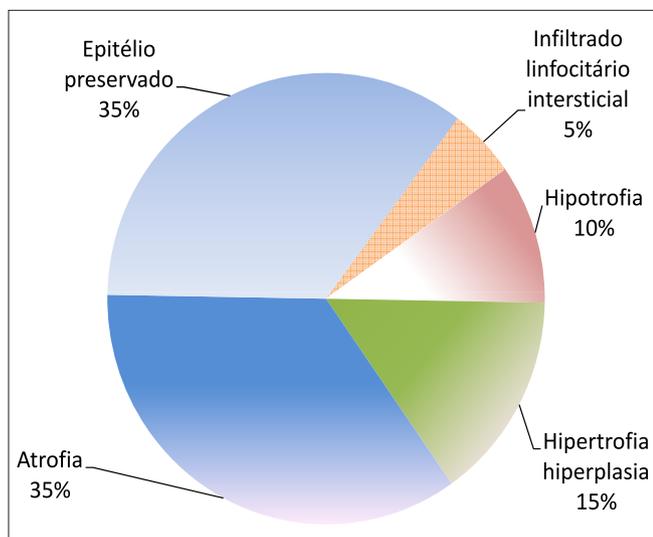


Figura 2 - Resultados da análise histopatológica.

hematoxilina e eosina. Foi empregado o teste estatístico de qui-quadrado e os resultados considerados significantes gerando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso dos animais

Não foram registradas alterações significativas nos pesos dos animais entre os grupos, os quais variaram de 300 a 460g, sendo que todos apresentaram ganho de peso durante o experimento.

Hemo-oximetria

Não ocorreu variação na taxa de hemoglobina e do oxigênio total ($p > 0,05$), porém a oxiemoglobina, a carboxiemoglobina, a metaemoglobina variaram. A oxiemoglobina teve elevação aos cinco e dez minutos de exposição à fumaça em comparação ao animal controle ($p < 0,005$). Os valores de carboxiemoglobina e metaemoglobina tiveram elevação significativa em comparação ao controle após dez minutos de exposição ($p < 0,05$), sendo que a carboxiemoglobina sofreu elevação acentuada (Tabela 1).

Tabela 1 - Hemo-oximetria dos animais expostos à fumaça aos 5 e 10 minutos e animal controle.

	Hb (g/dl)	HbO ₂	HbCO	MetHb	O ₂ total
Rato 1 – 5'	18,9	58,1	0,2	0,8	15,1
Rato 1 – 10'	18,9	58,6	6,8	1,4	15,2
Rato 2 – 5'	19,7	60,5	0,2	0,7	15,2
Rato 2 – 10'	19,7	60,4	7,1	1,5	15,4
Controle	19,8	45,9	0,4	0,6	14,4

Concentração de CO₂

O resultado obtido da concentração de dióxido de carbono (CO₂) no interior da câmara de exposição sempre mostrou uma medida maior que 999 partes por milhão (elevada acima do valor limite a tal ponto que o equipamento mostrava a mensagem "fora do valor limite" – Valor Limite: 999 ppm). Portanto, a concentração de CO₂ decorrente da queima dos cigarros na câmara de exposição onde se encontravam os animais era significativa.

Análise histopatológica

Não foram registradas lesões neoplásicas em nenhum animal de ambos os grupos.

Os resultados da histologia revelaram sete animais com atrofia, dois com hipotrofia e três com hiperplasia associada com hipertrofia do epitélio da bexiga urinária (Figura 2). Em três casos tais resultados apresentaram hipertrofia moderada da camada muscular do órgão. Apesar do tempo adequado de exposição, as alterações não se mostraram acentuadas em nenhum dos parâmetros. Tal fato pode ser evidenciado na análise do grupo controle ($p > 0,05$).

Nesse grupo, 50% das amostras apresentaram atrofia e 50% hipertrofia com hiperplasia do epitélio da bexiga sem alterações grosseiras. Portanto, não foram registradas lesões neoplásicas no experimento.

Resultados da análise histopatológica.

DISCUSSÃO

O tabaco contém mais de trinta carcinógenos conhecidos, a maioria composta por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas. Os estudos antigos apontavam que 20 a 30% das neoplasias de bexiga em mulheres eram causadas pelo tabaco. Hoje em dia, sabe-se que essa taxa subiu para 50% entre as mulheres e se manteve nesse valor para homens⁸. A mortalidade nos EUA para esse tipo de neoplasia é de 7,7 e 2,2 para cada 100.000 homens e mulheres, respectivamente⁹.

Existem poucos modelos experimentais de exposição à fumaça do cigarro, embora a maior parte deles seja empregada para camundongos. Os ratos Wistar e Sprague-Dawley, coelhos, cães e cobaias já foram empregados em pesquisas com diferentes câmaras de exposição

e sob diferentes protocolos, embora um modelo ideal ainda não exista. D'Agostini *et al.*¹⁰ estudaram o efeito quimioprotetor da N-acetil-cisteína em ratos Sprague-Dawley expostos à fumaça do cigarro em máquina de exposição TE-10.

Shapiro propôs uma câmara vedada com alta exposição ao conteúdo do tabaco para estudo da doença pulmonar obstrutiva crônica em camundongos¹¹. Seu modelo foi utilizado e modificado por Biselli *et al.*⁶, que estudou o efeito da exposição da fumaça do cigarro e resíduo de óleo diesel em pulmões de camundongos.

O presente estudo objetivou o desenvolvimento de modelos experimentais para carcinogênese em bexiga urinária em animais expostos à fumaça de cigarro.

Analisando-se os resultados obtidos pudemos inferir que o peso dos animais mostrou-se ascendente na análise isolada de cada espécime, não apresentando alterações, mostrando que a exposição ao tabaco não interferiu com o desenvolvimento normal dos animais.

A hemoximetria realizada em dois momentos durante o experimento possibilitou comprovar pela análise da carboxihemoglobina e metahemoglobina que o siste-

ma foi efetivo para propiciar aos animais inalarem as substâncias oriundas da queima do cigarro dentro da câmara de exposição. Ficou demonstrado, também, que a dose foi diretamente dependente do tempo de exposição. Portanto, pode-se afirmar que o sistema de simulação de tabagismo foi eficiente, tendo como ponto crítico o tempo de exposição. A intoxicação por CO e CO₂ foi tão elevada que provocou a morte de três animais no início do experimento, confirmando a alta intensidade de exposição dos animais às substâncias do tabaco e seus subprodutos de queima.

O exame histopatológico apresentou alterações leves e não significativas devido ao pequeno número de animais da amostra, sendo necessários novos experimentos no futuro, com maior tempo de exposição e maior número de animais.

Apesar de não ser observada neoplasia na mucosa da bexiga dos animais, o modelo experimental desenvolvido e aplicado foi eficiente, prático e de fácil utilização, podendo ser utilizado em outras pesquisas semelhantes para determinar os efeitos deletérios provocados pelo tabagismo.

A B S T R A C T

Purpose: To develop experimental models to evaluate the effects of the cigarette smoking in urinary bladder. **Methods:** Thirty young male Wistar rats divided in 2 groups, respectively simulating smoking and control group. **Results:** The histopathologic studies no recorded neoplasias, only mild changes and no significant alterations. The hemo-oximetry (carboxyhemoglobin and methemoglobin) and CO₂ concentration confirm that the animals were submitted to high intensity of exposure to carcinogens in tobacco and its derivatives. **Conclusion:** The experimental models were highly efficient, practical, easy to use and economical and can be employed in other similar studies to determine the harmful effects by smoking.

Key words: Animal Experimentation. Inhalation. Smoking. Rats. Urinary bladder neoplasms.

REFERENCIAS

- Escobar Arriaga E, Pérez Bautista O, Ramírez Venegas A, Sansores Raúl H. Efecto del daño de vías dopaminérgicas mesencefálicas en la conducta adictiva al tabaco: revisión generadora de una hipótesis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2007;20(1):56-63.
- Castro MG, Oliveira MS, Moraes JFD, Miguel AC, Araújo RB. Qualidade de vida e gravidade da dependência de tabaco. *Rev Psiquiatr Clín.* 2007;34(2):61-7.
- Portillo Martín JA, Rado Velázquez MA, Gutiérrez Baños JL, Correas Gómez MA, Hernández Rodríguez R, del Valle Schaan JJ, et al. Upper urinary tract tumours. *Actas Urol Esp.* 2004;28(1):7-12.
- Brazil. Ministry of Health. Federal Coordination. Brazilian National Cancer Institute (INCA). Prevention and Surveillance Coordination. Tobacco and other cancer risk factors control division. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005;21(6):775-7.
- Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(6 Pt 1):1422-8.
- Biselli PJ. Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/B16 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2008.
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306(7):737-45. Erratum in: *JAMA.* 2011;306(20):2220.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al, editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda. 2011. Disponível em http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/
- D'Agostini F, Balansky RM, Izzotti A, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Modulation of apoptosis by cigarette smoke and cancer chemopreventive agents in the respiratory tract of rats. *Carcinogenesis.* 2001;22(3):375-80.
- Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest.* 2000;117(5 Suppl 1):223S-7S.

Recebido em 30/09/2012
 Aceito para publicação em 22/12/2012
 Conflito de interesse: nenhum.
 Fonte de financiamento: nenhuma.

Como citar este artigo:

Colli Neto JA, Zen Júnior JH, Del Negro A, Adreollo NA, Araújo MR, Tincani AJ. Modelo experimental de tabagismo para indução de neoplasia da bexiga urinária. Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet] 2014;41(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

José Alexandre Colli Neto
E-mail: josealexandrecolli@gmail.com